

536,488

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

Rec'd PCT/PTO 24 MAY 2005

(43) 国際公開日  
2004年6月10日 (10.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/048587 A1

(51) 国際特許分類: C12P 19/14, A23K 1/16, 1/18, A61K 31/7016, A61P 31/04, C07H 3/04

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015092

(22) 国際出願日: 2003年11月26日 (26.11.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

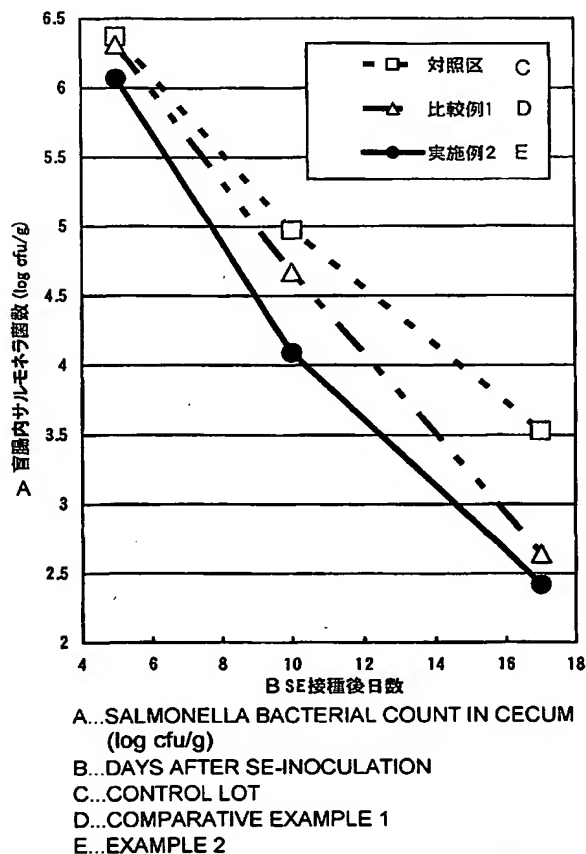
(30) 優先権データ:  
特願 2002-342892  
2002年11月26日 (26.11.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 伊藤忠飼料株式会社 (ITOCHU FEED MILLS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒136-8511 東京都江東区亀戸2丁目3番5号 Tokyo (JP). 不二製油株式会社 (FUJI OIL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒542-0086 大阪府大阪市中央区西心斎橋2丁目1番5号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 森腰 俊亨 (MORIKOSHI, Toshimichi) [JP/JP]; 〒325-0103 栃木県黒磯市青木919 伊藤忠飼料株式会社 研究所内 Tochigi (JP). 横溝 太 (YOKOMIZO, Futoshi) [JP/JP]; 〒

[続葉有]

(54) Title:  $\beta$ -1,4-MANNOBIOSE-CONTAINING COMPOSITION(54) 発明の名称:  $\beta$ -1, 4-マンノビオース含有組成物

$\beta$ -1, 4-マンノビオースを生成させることを特徴とする $\beta$ -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法、マンナン含有天然物にマンナン分解酵素を作用させて得られ、乾物換算で少なくとも10重量%以上の $\beta$ -1, 4-マンノビオースを含むことを特徴とする $\beta$ -1, 4-マンノビオース含有組成物、 $\beta$ -1, 4-マンノビオース

(57) Abstract: It is intended to provide a process for producing a composition containing  $\beta$ -1,4-mannobiose which can inhibit the fixation of salmonella in animal bodies and effectively discharge the salmonella therefrom; a feed additive comprising the composition containing  $\beta$ -1,4-mannobiose; and a feed comprising the composition containing  $\beta$ -1,4-mannobiose. Namely, a process for producing a composition containing  $\beta$ -1,4-mannobiose characterized by comprising treating a natural material containing mannan with a mannan digesting enzyme and thus forming at least 10% by weight, based on the mannan before the digestion, of  $\beta$ -1,4-mannobiose; a composition containing  $\beta$ -1,4-mannobiose characterized by being obtained by treating a natural material containing mannan with a mannan digesting enzyme and containing at least 10% by weight, in terms of dry matter, of  $\beta$ -1,4-mannobiose; a feed additive comprising the composition containing  $\beta$ -1,4-mannobiose; and a feed comprising the composition containing  $\beta$ -1,4-mannobiose.

(57) 要約: 動物体内でのサルモネラ菌の定着を抑制してサルモネラ菌を体外へ効率的に排出することができる $\beta$ -1, 4-マンノビオース含有組成物及びその製造方法、 $\beta$ -1, 4-マンノビオース含有組成物を含む飼料用添加剤や、 $\beta$ -1, 4-マンノビオース含有組成物を配合した飼料を提供するものである。マンナン含有天然物にマンナン分解酵素を作用させ、分解前のマンナンに対して少なくとも10重量%以上の

[続葉有]

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/048587 A1



598-8540 大阪府 泉佐野市 住吉町 1 不二製油株式会社  
社 阪南事業所内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052  
東京都 港区 赤坂二丁目 8 番 5 号若林ビル 3 階 Tokyo  
(JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS,  
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特  
許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッ  
パ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

$\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物

## 5 技術分野

本発明は、 $\beta$ -1, 4-マンノピオース ( $\beta$ -1,4-mannobiose) 含有組成物やその製造方法、 $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物を含む飼料用添加剤、及び $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物を配合した飼料、特に家畜又は家禽の腸内でのサルモネラ菌の定着を抑制しうる飼料に関する。

## 背景技術

従来より、パーム核ミール、コプラミール、グアーミール等には、マンノースを構成糖とするマンナンが豊富に含有されることが知られており、これらの天然原料に酵素を作用させてマンノース、マンノオリゴ糖、マンノース多糖類を生成させる方法が種々提案されている。また、このようなマンノース類が添加された飼料には、有害細菌であるサルモネラ菌の腸内での定着を抑制して体外へ排出する排菌効果（サルモネラ菌定着抑制効果）を有することが知られており、この効果を利用した技術も種々提案されている（Poultry Science, 68, p.1357, 1989）。

例えば、グアーミールやコプラミールなどマンナンを含む素材を酵素分解して得られる、マンノピオース及びマンノトリオースを主成分とし単糖類が混合したマンノオリゴ糖類を配合した飼料は、鶏の卵の品質を向上させることができることが報告されており、同時に、マンノオリゴ糖類がサルモネラ菌の家畜腸内での定着防止に有用である可能性があることが報告されている（特開平7-236429号公報）。また、マンノ

ース、メチル- $\alpha$ -マンノシド、マンノオリゴ糖や、グアーガム、ローカストビーンガム又は酵母から得られるマンナンの酵素及び／又は酸による加水分解物等のマンノース類を配合する飼料が、サルモネラ菌など有害細菌の感染予防に有用であることが報告されている（特開平 8-3  
5 8064 号公報）。さらには、マンノースの繰り返し単位が 40～100 の多糖を中心（30～80%）とし、オリゴ糖も（5～30%）混在するマンノース系多糖体を配合する家畜用飼料が、サルモネラ菌の家畜腸内での定着防止に効果があることが報告されている（特開平 8-173  
055 号公報）。また、パーム核ミールやグアーミール等のマンナンリッ  
10 チな原料に酵素を作用させてマンノオリゴ糖に分解したものを配合した飼料や、コブラミールに酵素を作用させたマンノースを含有する飼料、パーム核ミールを用いたマンノース及び／又はマンノオリゴ糖の製造方法が報告されている（国際公開第 95/17103 号パンフレット、国際公開第 99/08544 号パンフレット、特開 2001-23159  
15 1 号公報）。

以上のように種々の提案がなされているが、サルモネラ菌の家畜腸内での定着防止効果は十分でないのが現状であり、更なる改良が望まれている。例えば、マンノースにはサルモネラ菌定着抑制効果（サルモネラ菌排除効果）があるものの、それ自体単純な糖であるため、飼料として  
20 家畜に供与しても、大部分は腸内細菌類により簡単に資化されることがわかっており、また、家畜自身によっても消化吸收・排泄がなされるであろうと考えられる。また、本発明者らの実験結果によって、家畜の免疫強化のために生菌剤を投与した場合、さらにマンノース分解活性が強くなり、サルモネラ対策として給与したマンノースは大部分が消失する  
25 という知見が得られた。従って、実際に十分なサルモネラ菌の定着抑制効果を得るためには極めて多量のマンノースを投与しなければならない。

一方、酵母を用いた凝集試験によると、マンノピオースよりも分子量の大きなマンノオリゴ糖やマンノース系多糖体のサルモネラ菌定着抑制効果は小さいという知見が得られた。本発明はかかる実状に鑑みてなされたものであり、本発明の課題は、動物体内でのサルモネラ菌の定着を抑制してサルモネラ菌を体外へ効率的に排出することができる $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物及びその製造方法、 $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物を含む飼料用添加剤や、 $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物を配合した飼料を提供することにある。

本発明者らは鋭意研究の結果、 $\beta$ -1, 4-マンノピオースにサルモネラ認識活性があり、マンノースに比べサルモネラ認識能がやや劣るものの、家畜腸内の細菌類によって資化されにくいので、サルモネラ菌定着抑制においてはマンノース以上に有効に働き得るとの知見を得た。そこで、効率的な $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造方法を確立し、得られた $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物が高含量で $\beta$ -1, 4-マンノピオースを含むことを見い出し、本発明を完成するに至った。

#### 発明の開示

すなわち、本発明は、マンナン含有天然物にマンナン分解酵素を作用させ、分解前のマンナンに対して少なくとも10重量%以上の $\beta$ -1, 4-マンノピオースを生成させることを特徴とする $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造方法（請求項1）や、マンナン含有天然物から抽出したマンナンにマンナン分解酵素を作用させ、分解前のマンナンに対して少なくとも10重量%以上の $\beta$ -1, 4-マンノピオースを生成させることを特徴とする $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造方法（請求項2）や、マンナン100重量部に対して、50～100

00重量部の水を添加して、マンナン分解酵素を作用させることを特徴とする請求項1又は2記載の $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造方法(請求項3)や、マンナン分解酵素を作用させる温度が、40℃以上55℃以下であることを特徴とする請求項1~3のいずれか記載の

5  $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造方法(請求項4)や、分解前のマンナンに対して20~80重量%の $\beta$ -1, 4-マンノピオースを生成させることを特徴とする請求項1~4のいずれか記載の $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造方法(請求項5)や、マンナン含有天然物が、パーム核ミール及び/又はコプラミールであることを特徴

10 とする請求項1~5のいずれか記載の $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造方法(請求項6)に関する。

また、本発明は、請求項1~6のいずれか記載の製造方法により得られる $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物を含む飼料用添加剤(請求項7)や、請求項1~7のいずれか記載の製造方法により得られる $\beta$ -

15 1, 4-マンノピオース含有組成物を配合した、家畜又は家禽の腸内でのサルモネラ菌の定着を抑制しうることを特徴とする飼料(請求項8)や、 $\beta$ -1, 4-マンノピオースが0.001~1重量%含有されていることを特徴とする請求項8記載の飼料(請求項9)や、マンナン含有天然物にマンナン分解酵素を作用させて得られ、乾物換算で少なくとも

20 3重量%以上の $\beta$ -1, 4-マンノピオースを含むことを特徴とする $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物(請求項10)や、マンナン含有天然物から抽出したマンナンにマンナン分解酵素を作用させて得られ、乾物換算で少なくとも10重量%以上の $\beta$ -1, 4-マンノピオースを含むことを特徴とする $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物(請求項

25 11)や、マンナン含有天然物が、パーム核ミール及び/又はコプラミールであることを特徴とする請求項10又は11記載の $\beta$ -1, 4-マ

ンノビオース含有組成物（請求項 12）や、請求項 10～12 のいずれか記載の  $\beta$ -1, 4-マンノビオース含有組成物を含むことを特徴とする飼料用添加剤（請求項 13）や、請求項 10～12 のいずれか記載の  $\beta$ -1, 4-マンノビオース含有組成物を配合した、家畜又は家禽の腸  
5 内でのサルモネラ菌の定着を抑制しうることを特徴とする飼料（請求項 14）や、 $\beta$ -1, 4-マンノビオースが 0.001～1 重量%含有されていることを特徴とする請求項 14 記載の飼料（請求項 15）に関する。

## 10 図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明に係る飼料、比較例 1 に係る飼料、市販飼料を給与した採卵鶏初生オスヒナのサルモネラ菌接種後日数に対する盲腸内サルモネラ菌数を表すグラフである。

第 2 図は、本発明に係る飼料、比較例 2 に係る飼料、市販飼料を給与  
15 したブロイラー初生ヒナのサルモネラ菌接種後日数に対する盲腸内サルモネラ菌数を表すグラフである。

第 3 図は、本発明に係る飼料、比較例 2 に係る飼料、市販飼料を給与した 7 週令採卵鶏中雛のサルモネラ菌接種後日数に対する盲腸内サルモネラ菌数を表すグラフである。

## 20

### 発明を実施するための最良の形態

本発明の  $\beta$ -1, 4-マンノビオース含有組成物の製造方法としては、マンナン含有天然物にマンナン分解酵素を作用させ、マンナン含有天然物中のマンナンの加水分解等により、分解前のマンナンに対して少なくとも 10 重量%以上（10～100 重量%）の  $\beta$ -1, 4-マンノビオースを生成させる製造方法や、マンナン含有天然物から抽出したマンナ  
25

ンにマンナン分解酵素を作用させ、分解前のマンナンに対して少なくとも10重量%以上の $\beta$ -1, 4-マンノピオースを生成させる製造方法であれば特に制限されるものではないが、分解前のマンナンに対して20~80重量%の $\beta$ -1, 4-マンノピオースを生成させることが好ましく、30~80重量%の $\beta$ -1, 4-マンノピオースを生成させることがさらに好ましい。

本発明の $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物としては、マンナン含有天然物にマンナン分解酵素を作用させて得られ、乾物換算で少なくとも3重量%以上の $\beta$ -1, 4-マンノピオースを含む $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物や、マンナン含有天然物から抽出したマンナンにマンナン分解酵素を作用させて得られ、乾物換算で少なくとも10重量%以上の $\beta$ -1, 4-マンノピオースを含む $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物であれば特に制限されるものではなく、かかる $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物は、例えば、上記本発明の $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造方法により製造することができる。

本発明の飼料用添加剤としては、上記本発明の $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造方法により得られる $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物や、上記本発明の $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物を含む飼料用添加剤であれば特に制限されるものではなく、かかる飼料用添加剤として、これら $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物からなるものや、これら $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物に保存料等の他の添加成分が配合されたものを例示することができる。

また、上記 $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物や飼料用添加剤の使用形態としては、酵素処理物そのものやその乾燥物、酵素処理後にマンノピオースを水等により抽出したその抽出物やその乾燥物など特に制限されるものではない。



上記マンナン含有天然物としては、 $\beta$ -1, 4 結合したマンノースを含有するものであれば特に制限されるものではなく、例えば、コブラミール、パーム核ミール、グアーミール等の高等植物由来のマンナンを挙げることができる。入手の容易な点、マンナンリッチな点等から、コブラミール、パーム核ミールが好ましい。また、マンナン含有天然物から、ミセルを作り水不溶のマンナンを抽出する方法としては、アルカリ溶液、例えば 5 % 冷水酸化ナトリウム液や、10 % 水酸化ナトリウム液での抽出方法を例示することができる。

使用するマンナン分解酵素としては、マンナナーゼ、マンノシダーゼ、ヘミセルラーゼ等のマンナンを分解し  $\beta$ -1, 4-マンノピオースを生成する活性を有するものや、マンナンから生成したマンノースから  $\beta$ -1, 4-マンノピオース合成する活性を有するものであれば特に制限されるものではないが、*Aspergillus niger* 由来のもので、市販されているもの、例えば、ヘミセルラーゼ GM「アマノ」(天野製薬株式会社製)、スミチーム ACH 及びスミチーム ACH-L (新日本化学工業株式会社製)、セルロシン GM 5 (阪急バイオインダストリー株式会社製) 等を好適に使用することができるほか、キシラナーゼ、セルラーゼとして市販されているものでも当該加水分解活性のあるものが使用でき、例えば、セルラーゼ Y-NC (ヤクルト薬品工業株式会社製) 等を使用することができる。これらの中でも、マンノシダーゼ (exo 型) 活性が低く、マンナナーゼ (endo 型) 活性が高い酵素が好ましく、具体的には、ヘミセルラーゼ GM「アマノ」(天野製薬株式会社製)、スミチーム ACH 及びスミチーム ACH-L (新日本化学工業株式会社製) が、マンノースの生成を抑えると共に多量にマンノピオースを生成させることができることから好ましい。このように、 $\beta$ -1, 4-マンノピオースは、 $\beta$ -1, 4-マンナン ( $\beta$ -1,4-Mannan) を分解する方法によっても得ることが

でき、マンノースから合成する方法によって得ることもできるが、その原料の資源性及び反応効率の観点から、 $\beta$ -1, 4-マンナンを分解する方法がより簡便であり好ましい。

- 本発明の $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造においては、
- 5 マンナン含有天然物又はマンナン含有天然物から抽出したマンナンにマンナン分解酵素を作用させるが、かかるマンナン分解酵素は、水に溶解あるいは分散させた酵素液として用いることが好ましい。効率的な反応を行うためには、マンナン含有天然物又はマンナン、マンナン分解酵素及び水からなる反応系における水分の調整が重要である。水分調整のため
- 10 の水の添加量としては、マンナン100重量部に対して50～1000重量部であることが好ましく、100～1500重量部であることがより好ましい。水の添加量を上記範囲とすることにより、反応系に十分な水分が存在し、マンナン類の繊維質が十分に膨潤して酵素液が接触しやすくなり、効率的にマンノピオースを生成することができる。また、
- 15 上記範囲にすることにより、水分過多によって生じる酵素濃度希釈に伴う反応効率の低下を抑制することができると共に、乾燥工程における乾燥コストの上昇を抑制することができる。また、酵素量、反応時間としては、生成するマンノピオースが分解前のマンナンに対して少なくとも10重量%となれば特に制限はないが、マンナーゼ（endo型）活性
- 20 が高い酵素を使用した場合でも、通常マンノシダーゼ（exo型）活性も有しておりマンノピオースが分解されるため、反応時間を必要以上に長時間としないことが好ましい。また、反応温度は40～65℃で好適であるが、高温になるほどマンノシダーゼの活性が高くなりマンノースの生成量が増加するので、マンノースの生成を抑えると共に、多量にマン
- 25 ノピオースを生成させたい場合は、40～55℃、より好ましくは、45～53℃での反応が良い。

例えば、原料としてパームカーネルミール（マンナン含有量は、およそ 36 重量%）を用いて 3 ～ 36 時間反応させた場合、 $\beta$ -1, 4-マンノピオース量は使用する酵素の種類や量、時間にもよるが、原料 100 重量部に対して、6 ～ 17 重量部程度まで生成することができる。本発明の  $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造方法により得られる  $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の中でも、乾物換算で少なくとも 3 重量%以上、好ましくは 10 重量%以上の  $\beta$ -1, 4-マンノピオースを含有するものが飼料用添加剤又は飼料として好ましい。

本発明の  $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物は、家畜又は家禽腸内におけるサルモネラ菌の定着を抑制のための飼料用添加剤として使用することができ、家畜の免疫強化のために成鶏盲腸内容菌などの生菌剤を併用する場合においては資化されにくいことから特に有用である。 $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物は、例えば、そのまま飼料として用いることができ、飼料に添加することもできる。この  $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物は、マンノピオースの他にマンノースやマンノオリゴ糖類なども含有するが、特にマンノピオースのみを抽出・精製する必要はなく、むしろこれらが含まれていることが好ましい。 $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物を飼料に添加する場合、マンノピオースが、飼料中、0.001 ～ 1 重量%含有されるように添加することが好ましく、0.005 ～ 0.1 重量%含有されるように添加することがより好ましい。マンノピオースの含有量が上記範囲にあることにより本発明の効果をより効率的に奏することができる。また、 $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物を例えば飼料添加剤としてそのまま流通、使用する場合には、黴、菌類の発生が危惧されることになるため、流動層乾燥、真空乾燥等の方法によって、水分が 10 重量%以下となるように乾燥することが好ましい。

本発明のサルモネラ菌の定着を抑制しうる飼料としては、上記本発明の $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造方法により得られる $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物や、上記本発明の $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物を配合した飼料であれば特に制限されるものではなく、かかる本発明の飼料を家畜又は家禽に、固体状若しくは液状で給餌することにより、動物体内のサルモネラ菌の定着を抑制してサルモネラ菌を体外へ効率的に排出することができる。 $\beta$ -1, 4-マンノピオースは、マンノースに比べサルモネラ認識能がやや劣るものの、家畜腸内の細菌類によって資化されにくいので、サルモネラ菌定着抑制においてはマンノース以上に有効に働き、効率的にサルモネラ菌を体外へ排出することができ、飼料中のマンノース類の含有量を少量化することが可能となって、経済的負担が大幅に軽減されることになる。

以下、本発明の実施例を示し、本発明を詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。実施例中の「部」、「%」は、特に断りがない限り、それぞれ「重量部」、「重量%」を表す。

実施例 1（パームカーネルミールから $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造）

マンナン含有量 36%、水分 8.2% のパームカーネルミール（不二製油株式会社製）100部に、酵素ヘミセルラーゼ GM「アマノ」（天野製薬株式会社製）0.25部を溶解した酵素液 150部を、60℃で 12時間作用させた後、流動層乾燥装置（大河原製作所製）にて水分 9.8%まで乾燥させ、乾燥粉体 102部を得た。この乾燥粉体のマンノース含有量及び $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有量をイオン交換クロマトグラフィ法で測定したところ、マンノースが 1.44部、 $\beta$ -1, 4-

マンノピオースが 10.58 部（マンナンに対し 29.4%；乾物換算で 11.5%）生成していた。

## 5 実施例 2（コブラミールから $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造）

コブラミール（マンナン含有量 30%、水分 4.2%）100 部に、酵素ヘミセルラーゼ GM「アマノ」（天野製薬株式会社製）0.25 部を溶解した酵素液 150 部を、60℃で 12 時間作用させた後、流動層乾燥装置にて水分 9.3%まで乾燥させ、乾燥粉体 106 部を得た。この乾燥粉体のマンノース含有量及び  $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有量を測定したところ、マンノースが 1.36 部、 $\beta$ -1, 4-マンノピオースが 12.35 部（マンナンに対し 41.2%；乾物換算で 12.9%）生成していた。

## 15 比較例 1

パームカーネルミール（マンナン含有量 36%、水分 8.2%）100 部に、酵素セルロシン GM5（エイチビィアイ株式会社製）0.3 部を溶解した酵素液 150 部を、60℃で 72 時間作用させた後、流動層乾燥装置にて水分 7.8%まで乾燥させ、乾燥粉体 100 部を得た。この乾燥粉体のマンノース含有量及び  $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有量を測定したところ、マンノースが 11.52 部、 $\beta$ -1, 4-マンノピオースが 2.57 部（マンナンに対し 7.14%；乾物換算で 2.79%）生成していた。

## 25 実施例 3（サルモネラ菌・酵母凝集抑制試験）

各種糖類のサルモネラ菌凝集抑制試験を以下のように行った。サルモ

ネラ菌サルモネラ・エンテリティディス（伊藤忠飼料株式会社にて分離した *Salmonella enteritidis* KTE-61 株 菌数  $1 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$ ）の懸濁液 0.1 ml 及び蒸留水 0.1 ml を十分混合させ、これに酵母キャンディダ・アルビカンス（社団法人動物用生物学的製剤協会より購入した *Candida albicans* KI-102001）懸濁液 0.1 ml を加え混合した。この混合液に凝集が生じることを実体顕微鏡（オリンパス社製）で確認する予備試験を行った。

実施例 1 で得られた乾燥粉体 0.5 g を水 5 ml に混合懸濁した後、10000 rpm で 5 分間遠心分離し、その遠心上清から高速液体クロマトグラフィ（日本分光社製）により、 $\beta$ -1, 4-マンノピオースを約 10 mg 分取した。次に、上記予備試験と同様の方法で、蒸留水に代えて上記分取した  $\beta$ -1, 4-マンノピオース及びマンノース試薬（和光純薬社製；D-Mannose）を使用した糖水溶液を用い、それぞれ濃度を変化させて混合液の凝集を阻害する最低濃度（凝集抑制最低濃度）を求めた。表 1 に、混合液の凝集を阻害する実際の凝集抑制最低濃度、及びマンノースの凝集抑制最低濃度を 1 とした場合の相対濃度（濃度比）を示す。表 1 から明らかなように、 $\beta$ -1, 4-マンノピオースは、サルモネラ菌による凝集を阻害するためにはマンノースの 2 倍程度の量が必要となることが判明した。

（表 1）

	実際の濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	相対濃度 (対マンノース)
マンノース(D-mannose)	594	1.000
マンノピオース	1290	2.173

#### 実施例 4（代謝試験）

実施例 1、実施例 2 及び比較例 1 で得られた乾燥粉体に水を加え 10 倍量の懸濁液とした。また、マンノース試薬の 1 % 水溶液を準備した。以上 4 点の懸濁液又は水溶液に鶏盲腸内容構成菌培養物であるインテク  
 5 リーン（伊藤忠飼料株式会社製）を接種し、37℃にてマンノース、 $\beta$ -1, 4-マンノピオースの代謝を調査した。培養開始時及び 20 時間培養後の懸濁液又は溶液をサンプリングし、10000 rpm で 10 分間の遠心分離後、その上澄をイオン交換クロマトグラフィにてそれぞれの成分の含有量 (mg/g) を調べた。その結果を表 2 に示す。表 2 から明らかなように、比較例 1 のマンノースは 66 % 減少し、マンノース  
 10 試薬においても 69 % が減少しており、マンノースは腸内細菌により非常に代謝されやすいことが判明した。これに対し、実施例 1 の  $\beta$ -1, 4-マンノピオースの減少量は 16 % であり、実施例 2 においても  $\beta$ -1, 4-マンノピオースの減少量は 17 % であり、マンノースに比して  
 15 明らかに代謝率が低いことが判明した。

（表 2）

	培養開始時 (mg/g)		20 時間嫌気培養後 (mg/g)	
	マンノース	マンノピオース	マンノース	マンノピオース
実施例 1	1.88	10.91	0.03	9.15
実施例 2	1.76	12.15	0	10.03
比較例 1	10.45	2.53	3.57	2.12
マンノース 1 %	9.45	0	2.93	0

上記凝集試験及び代謝試験の結果から、 $\beta$ -1, 4-マンノピオース  
 20 は、マンノースに比べサルモネラ認識能がやや劣るもの、家畜腸内の細

- 菌類によって資化されにくいので、サルモネラ菌定着抑制においてはマンノース以上に有効に働き、効率的にサルモネラ菌を体外へ排出することができることがわかる。また、代謝試験の結果より $\beta$ -1, 4-マンノビオースは資化されにくいので、家畜の免疫強化のために成鶏盲腸内容菌などの生菌剤を併用する場合に特に有用であることがわかる。

#### 実施例 5（動物試験）

- 市販コマーシャル採卵鶏初生オスヒナ 150羽を3分し、市販コマーシャルプロイラー用配合飼料（商品名:アマタケS、薬剤無添加／伊藤忠飼料株式会社製）を給与した50羽の対照区、同配合飼料に実施例2で得られた乾燥粉体を0.1%添加した飼料を給与した50羽の区、及び比較例1で得られた乾燥粉体を0.1%添加した飼料を給与した50羽の区の合計3区を設定し、不断給餌、自由飲水にて飼育した。3日令でサルモネラ菌（*Salmonella enteritidis* KTE-61株）、 $3.9 \times 10^8$  cfu/羽を経口接種させた。サルモネラ菌接種後5日、10日、17日において各区、盲腸内容物中のサルモネラ菌数（対数）を調べた。その結果を表3に示し、それをグラフで表したものが第1図である。

（表 3）

	SE接種後5日 (log cfu/g)	SE接種後10日 (log cfu/g)	SE接種後17日 (log cfu/g)
対照区(無添加)	6.37	4.97	3.53
比較例1 (酵素処理パーム核ミール、 マンノース型)	6.31	4.67	2.64
実施例2 (酵素処理コブラミール、 $\beta$ マンノビオース型)	6.07	4.09	2.42



表 3 及び図 1 から明らかなように、実施例 2 で得られた乾燥粉体を添加した飼料を給与した区及び比較例 1 で得られた乾燥粉体を添加した飼料を給与した区はともに全試験期間を通じて対照区より菌数が少なく、サルモネラ菌を有効に減少させていることが判明したが、特に実施例 2  
5 で得られた乾燥粉体を添加した飼料を給与した区は、比較例 1 で得られた乾燥粉体を添加した飼料を給与した区に比してより少ない菌数を示しており、さらに効果的に作用することが判明した。

10 実施例 6（コブラミールから  $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造）

コブラミール 100 部に酵素スミチーム ACH（新日本化学工業株式会社製）0.25 部を溶解した酵素液 125 部を 50℃、22 時間作用させた後、流動層乾燥装置にて水分 7.1% まで乾燥、乾燥粉体 103 部を得た。この乾燥粉体にはマンノース 1.17 部、マンノピオース 1  
15 4.18 部（マンナンに対し 47.3%）が生成していた。

#### 比較例 2

コブラミール 100 部に酵素セルロシン GM5（エイチビィアイ株式会社製）0.3 部を溶解した酵素液 150 部を 60℃、72 時間作用させた後、流動層乾燥装置にて水分 6.4% まで乾燥、乾燥粉体 100 部  
20 を得た。この乾燥粉体にはマンノース 13.72 部、マンノピオース 0.64 部（マンナンに対し 2.13%）が生成していた。

#### 実施例 7（動物試験 2、ブロイラーヒナでの効果）

25 市販コマーシャルブロイラー初生ヒナ 45 羽を 3 分し、市販コマーシャルブロイラー用配合飼料（商品名アマタケ S、薬剤無添加／伊藤忠飼

料株式会社製)を給与した15羽を対照区とし、同配合飼料に実施例6で得られた乾燥粉体を0.1%添加し給与した区15羽、比較例2で得られた乾燥粉体を0.1%添加した給与した区15羽の合計3区を設定し、不断給餌、自由飲水にて1週間予備飼育した。1週令でサルモネラ菌 (*Salmonella enteritidis* HY-1株)、 $2.27 \times 10^7$  cfu/羽を経口接種した。サルモネラ菌接種後1週間後、2週間後、3週間後において各区5羽ずつ解剖し、盲腸内容物中のサルモネラ菌数(対数)を調べた。

その結果を表4に示し、それをグラフで示したものが第2図である。

10

(表4)

	SE接種後1週 (log cfu/g)	SE接種後2週 (log cfu/g)	SE接種後3週 (log cfu/g)
対照区(無添加)	1.84	2.00	4.34
比較例2 (酵素処理コブラミール、 マンノース型)	1.84	2.22	2.47
実施例6 (酵素処理コブラミール、 $\beta$ マンノピオース型)	2.74	1.60	0.80

実施例6で得られた乾燥粉体を添加した飼料を給与した区および比較例2で得られた乾燥粉体を添加した飼料を給与した区はともにSE接種後3週目において対照区より菌数が少なく、サルモネラ菌を減少させていることが判明したが、特に実施例6で得られた乾燥粉体を添加した飼料を給与した区は、比較例2で得られた乾燥粉体を添加した飼料を給与した区より少ない菌数を示しており、さらに効果的に作用することが判明した。

20

# 実施例 8（動物試験 3、採卵鶏中雛での効果）

7 週令採卵鶏中雛 30 羽を 3 分し、市販コマーシャルブロイラー用配合飼料（商品名アマタケ S、薬剤無添加／伊藤忠飼料株式会社製）を給与した 10 羽を対照区とし、同配合飼料に実施例 6 で得られた乾燥粉体を 0.1 % 添加し給与した区 10 羽、比較例 2 で得られた乾燥粉体を 0.1 % 添加した給与した区 10 羽の合計 3 区を設定し、不断給餌、自由飲水にて 1 週間予備飼育した。その後、サルモネラ菌（*Salmonella enteritidis* HY-1 株）、 $1.13 \times 10^8$  cfu / 羽を経口接種した。サルモネラ菌接種後 1 週間後、2 週間後、3 週間後、4 週間後において盲腸便を採取し、盲腸便におけるサルモネラ菌数（対数）を調べた。その結果を表 5 に示し、それをグラフで示したものが第 3 図である。

（表 5）

	SE 接種後 1 週 (log cfu / g)	SE 接種後 2 週 (log cfu / g)	SE 接種後 3 週 (log cfu / g)	SE 接種後 4 週 (log cfu / g)
対照区（無添加）	3.63	2.74	0.96	0.60
比較例 2 （酵素処理コブラミール、 マンノース型）	2.19	1.78	1.06	0.80
実施例 6 （酵素処理コブラミール、 $\beta$ マンノビオース型）	2.39	1.26	0.70	0.40

実施例 6 で得られた乾燥粉体を添加した飼料を給与した区および比較例 2 で得られた乾燥粉体を添加した飼料を給与した区はともに SE 接種後 1 週目 2 週目において対照区より菌数が少なく、サルモネラ菌を減少させていることが判明したが、特に実施例 6 で得られた乾燥粉体を添加した飼料を給与した区は、比較例 2 で得られた乾燥粉体を添加した飼料を給与した区より全期間を通じて少ない菌数を示しており、さらに効果

的に作用することが判明した。

#### 産業上の利用可能性

- 5 本発明によれば、動物体内でのサルモネラ菌の定着を抑制してサルモネラ菌を体外へ効率的に排出することができる  $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物及びその製造方法、 $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物を含む飼料用添加剤や、 $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物を配合した飼料を提供することができる。

## 請 求 の 範 囲

1. マンナン含有天然物にマンナン分解酵素を作用させ、分解前のマンナンに対して少なくとも10重量%以上の $\beta$ -1, 4-マンノピオースを生成させることを特徴とする $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造方法。

2. マンナン含有天然物から抽出したマンナンにマンナン分解酵素を作用させ、分解前のマンナンに対して少なくとも10重量%以上の $\beta$ -1, 4-マンノピオースを生成させることを特徴とする $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造方法。

3. マンナン100重量部に対して、50～10000重量部の水を添加して、マンナン分解酵素を作用させることを特徴とする請求項1又は2記載の $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造方法。

4. マンナン分解酵素を作用させる温度が、40℃以上55℃以下であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造方法。

5. 分解前のマンナンに対して20～80重量%の $\beta$ -1, 4-マンノピオースを生成させることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造方法。

6. マンナン含有天然物が、パーム核ミール及び／又はコブラミールであることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物の製造方法。

7. 請求項1～6のいずれか記載の製造方法により得られる $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物を含む飼料用添加剤。

8. 請求項1～7のいずれか記載の製造方法により得られる $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物を配合した、家畜又は家禽の腸内でのサ

ルモネラ菌の定着を抑制しうることを特徴とする飼料。

9.  $\beta$ -1, 4-マンノピオースが0.001~1重量%含有されていることを特徴とする請求項8記載の飼料。

10. マンナン含有天然物にマンナン分解酵素を作用させて得られ、  
5 乾物換算で少なくとも3重量%以上の $\beta$ -1, 4-マンノピオースを含むことを特徴とする $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物。

11. マンナン含有天然物から抽出したマンナンにマンナン分解酵素を作用させて得られ、乾物換算で少なくとも10重量%以上の $\beta$ -1, 4-マンノピオースを含むことを特徴とする $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物。  
10

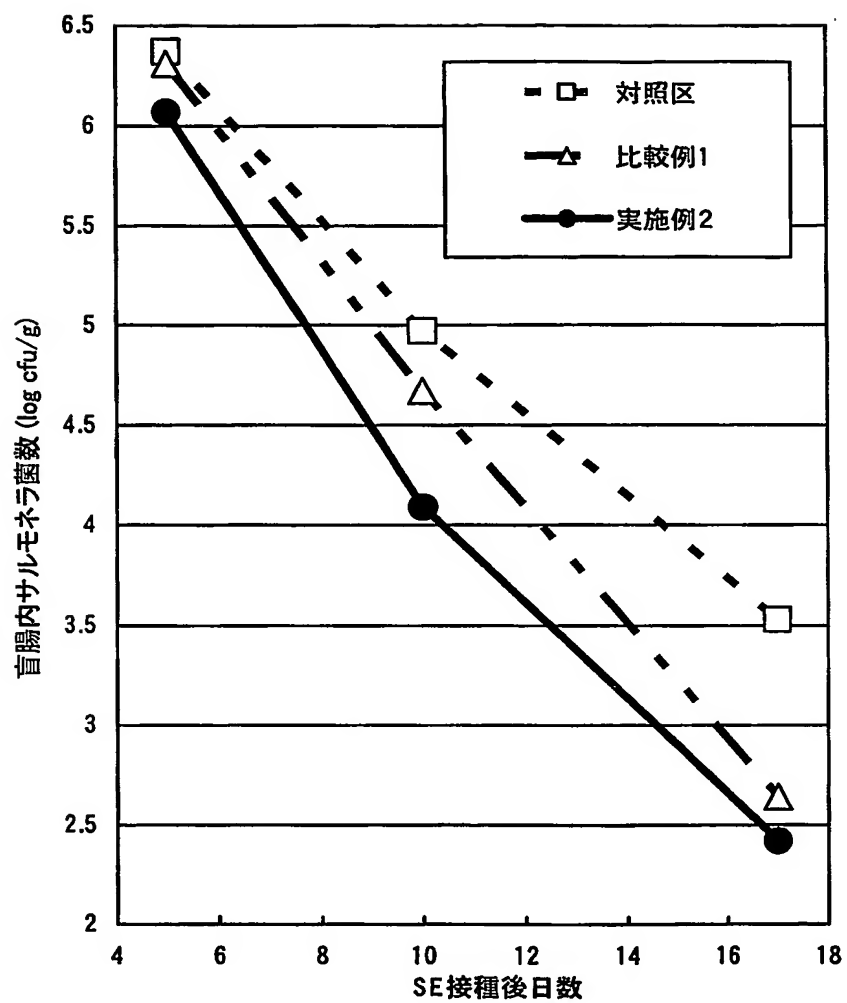
12. マンナン含有天然物が、パーム核ミール及び／又はコプラミールであることを特徴とする請求項10又は11記載の $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物。

13. 請求項10~12のいずれか記載の $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物を含むことを特徴とする飼料用添加剤。  
15

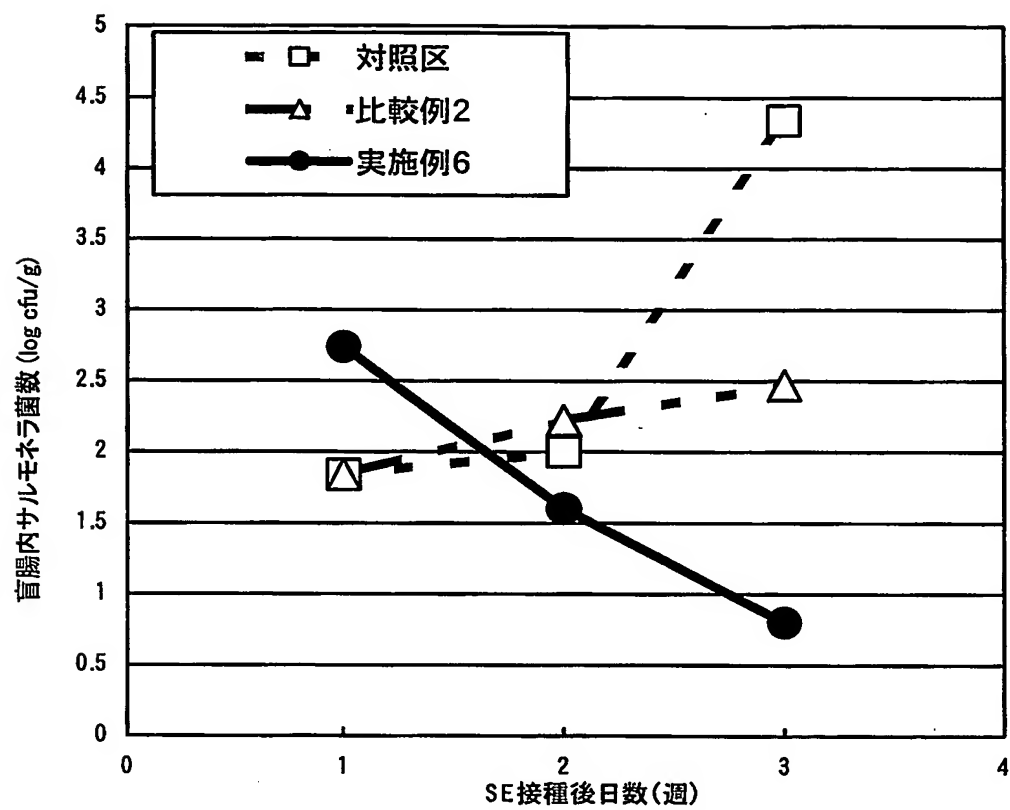
14. 請求項10~12のいずれか記載の $\beta$ -1, 4-マンノピオース含有組成物を配合した、家畜又は家禽の腸内でのサルモネラ菌の定着を抑制しうることを特徴とする飼料。

15.  $\beta$ -1, 4-マンノピオースが0.001~1重量%含有されていることを特徴とする請求項14記載の飼料。  
20

## 第 1 図

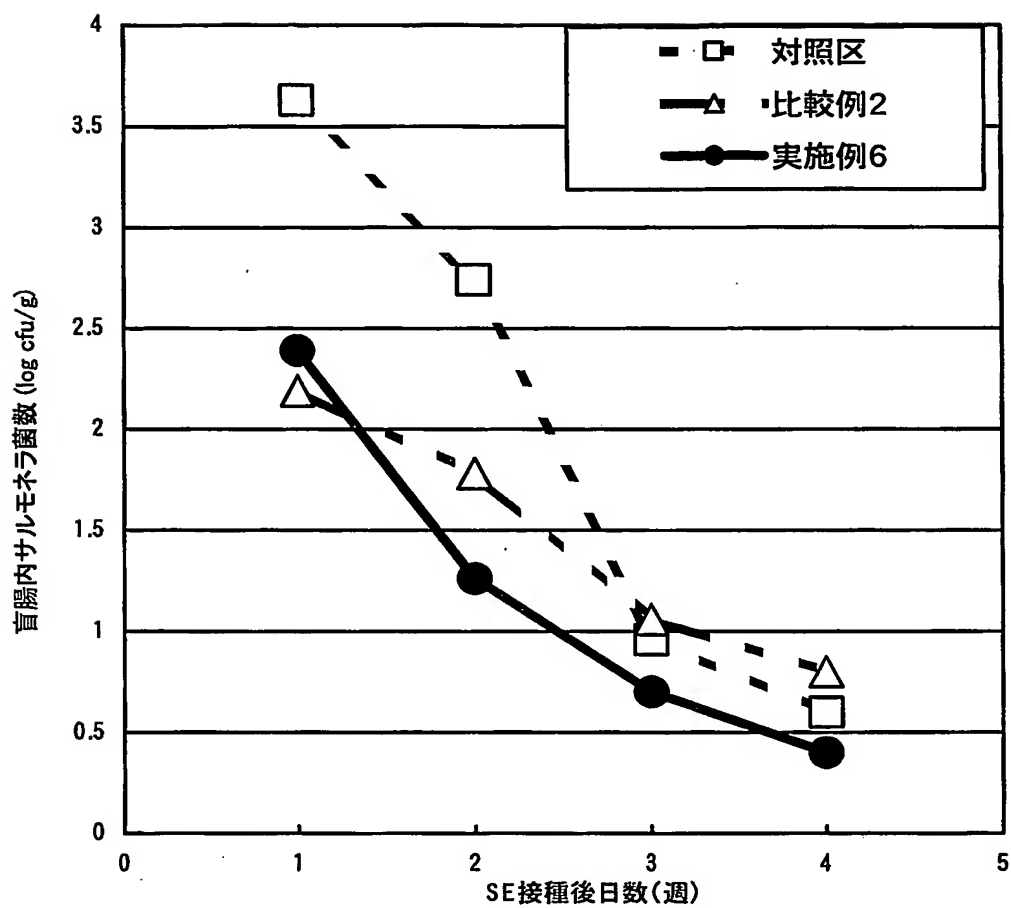


第 2 図





## 第 3 図



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15092

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12P19/14, A23K1/16, A23K1/18, A61K31/7016, A61P31/04,  
C07H3/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12P19/00-64, A23K1/16, A23K1/18, A61K31/7016, A61P31/04,  
C07H3/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 11-18793 A (Unitika Ltd.), 26 January, 1999 (26.01.99), Full text (Family: none)	1-15/ 7-9, 13-15
X/Y	JP 2001-231591 A (Unitika Ltd.), 28 August, 2001 (28.08.01), Full text (Family: none)	1-15/ 7-9, 13-15
X/Y	JP 2000-245357 A (Fuji Oil Co., Ltd.), 12 September, 2000 (12.09.00), Full text (Family: none)	1-15/ 7-9, 13-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
19 December, 2003 (19.12.03)

Date of mailing of the international search report  
13 January, 2004 (13.01.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15092

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 7-236429 A (Yugen Kaisha Seibutsu Kagaku Sangyo Kenkyusho), 12 September, 1995 (12.09.95), Full text (Family: none)	1-15/ 7-9,13-15
X/Y	JP 63-209595 A (Towa Chemical Industry Co., Ltd.), 31 August, 1988 (31.08.88), Full text (Family: none)	1-6,10-12/ 7-9,13-15
X/Y	KUSAKABE, I. et al., Preparation of $\beta$ -1,4-Mannobiose from White Copra Meal by a Mannanase from <i>Penicillium purpurogenum</i> , Agric.Biol.Chem. (1987), Vol.51, No.10, pages 2825 to 2826	1-6,10-12/ 7-9,13-15

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12P 19/14, A23K 1/16, A23K 1/18,  
A61K 31/7016, A61P 31/04, C07H 3/04

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12P 19/00-64, A23K 1/16, A23K 1/18,  
A61K 31/7016, A61P 31/04, C07H 3/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	JP 11-18793 A (ユニチカ株式会社) 1999. 01. 26, 全文 (ファミリーなし)	1-15/ 7-9, 13-15
X/Y	JP 2001-231591 A (ユニチカ株式会社) 2001. 08. 28, 全文 (ファミリーなし)	1-15/ 7-9, 13-15
X/Y	JP 2000-245357 A (不二製油株式会社) 2000. 09. 12, 全文 (ファミリーなし)	1-15/ 7-9, 13-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
19. 12. 03

国際調査報告の発送日  
13.01.04

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
長井 啓子



4N 3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	JP 7-236429 A (有限会社生物科学産業研究所) 1995. 09. 12, 全文 (ファミリーなし)	1-15/ 7-9, 13-15
X/Y	JP 63-209595 A (東和化成工業株式会社) 1988. 08. 31, 全文 (ファミリーなし)	1-6, 10-12/ 7-9, 13-15
X/Y	KUSAKABE, I. et al., Preparation of $\beta$ -1, 4-Mannobiose from White Copra Meal by a Mannanase from <i>Penicillium purpurogenum</i> , Agric. Biol. Chem. (1987) Vol. 51, No. 10, p. 2825-2826	1-6, 10-12/ 7-9, 13-15

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**